PROPIEDADES ANTICOAGULANTES DE EXTRACTOS DE ALGAS MARINAS MEXICANAS: *HALIMEDA DISCOIDEA* (CHLOROPHYTA) CON ACTIVIDAD SEMEJANTE A LA HEPARINA

Graciela de LARA ISASSI y Sergio ALVAREZ HERNÁNDEZ

Laboratorio de Ficología Aplicada. Departamento de Hidrobiología.
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Apartado Postal 55-535.
México, D.F., 09340. Fax (5) 612-08-85.

ABSTRACT - In this work it is reported the presence of anticoagulant substances on algae, acting as inhibitors of the conversion of fibrinogen to fibrin. 34 aqueous mexican marine algal extracts have been screened by standard clotting tests (thrombin and prothrombin times) comparing the results with the effect produced by heparin. It was used normal human plasma obtained by direct venous puncture using tri-sodium-citrate [redacted] anticoagulant. In the thrombin time test, the species that prove to have the same anticoagulant effect of heparin were: *Halimeda discoidea*, *Codium giraffa* (Chlorophyta) and *Sargassum histrix* (Phaeophyta), in the prothrombin time test only *Halimeda discoidea* showed anticoagulant activity. In general, the algal species tested showed less anticoagulant power than the reference anticoagulant.

RESUMEN - En este trabajo se reporta la presencia de substancias anticoagulantes que interfieren en la conversión de fibrinogeno a fibrina. Se probaron 34 extractos acuosos de macroalgas marinas utilizando pruebas estandarizadas de coagulación de plasma humano (tiempo de trombina y tiempo de protrombina), comparando los resultados contra un testigo de heparina. Se utilizó plama humano normal obtenido por punción venosa y se usó citrato de sodio como anticoagulante. En el tiempo de trombina, las especies que tuvieron el mismo efecto anticoagulante que la heparina fueron: *Halimeda discoidea, Codium giraffa* (Chlorophyta); *Sargassum histrix* (Phaeophyta) y para la prueba de tiempo de protrombina sólo *Halimeda discoidea* mostró actividad anticoagulante. En general, las especies probadas mostraron menor poder anticoagulante que la heparina.

KEY-WORDS - *Halimeda discoidea*, anticoagulant extracts, heparin-like potency.

INTRODUCCION

La coagulación de la sangre humana constituye en el hombre la defensa hemostatica más importante en la regulación del equilibrio corporal. Este tejido vital es conservado utilizando el anticoagulante heparina, mucopolisacárido altamente sulfatado que puede ser encontrado en muchos tejidos animales.

Source : MNHN, Paris

Las macroalgas marinas poseen polisacáridos sulfatados en diferentes proporciones, siendo heteropolisacáridos polidispersos los que se encuentran en las especies de la División Chlorophyta, donde los principales grupos que aparecen son glucoronoxylorhamanos, glucoronoxylorhamagalactanos y xyloarabinogalactanos. En la División Rhodophyta se encuentran galactanos, mejor conocidos como agar, compuestos básicamente de los estereoisómeros D y/o L-galactosa y acido D-glucorónico. En el agar se presentan cantidades variables de ésteres sulfato y los carragenanos están compuestos mayormente por unidades de D-galactosa altamente sulfatada (20 a 25 %). Los fucoidanos son dos polisacáridos sulfatados presentes en los representantes de la División Phaeophyta, estos fucoidanos se integran por compuestos como el ascophyllano, sargasano y glucuronoxylofucano (Percival, 1979).

Se han encontrado propiedades anticoagulantes de los fucoidanos presentes en algas de la División Phaeophyta particularmente en *Fucus vesiculosus* Linnaeus (Springer *et al.*, 1957) y *Ecklonia kurome* Okamura (Nishino *et al.*, 1991), asi como en los derivados sulfatados de la laminarina (Hawkins & O'Neill, 1955). En la División Rhodophyta se ha descrito este tipo de actividad en los carragenanos de *Chondrus crispus* Stackhouse, *Eucheuma spinosum* (Linnaeus) J. Agardh, *Iridea laminarioides* Bory (Elsner *et al.*, 1937), *Polyides rotundus* (Hudson) Greville (Anderson & Duncan, 1965) y *Corallina rubens* (Güven *et al.*, 1973 y 1974).

La actividad fibrinolítica y antiagregante de carragenanos ha sido investigada por Vargaftig (1979), Kidness *et al.* (1979), Deacon-Smith *et al.* (1985) y Güven *et al.* (1991).

Nishino *et al.* (1991) aislaron, purificaron y caracterizaron fucoidanos sulfatados en diferentes proporciones (denominados C-I y C-II) del alga café *Ecklonia kurome*; que mostraron actividad anticoagulante en un 85 % en comparación con la heparina.

La relativamente pobre información sobre las propiedades anticoagulantes de las macroalgas, la diversa composición de los carbohidratos, asi como la diferente proporción de los grupos sulfatados presentes en algunas de ellas, las hace un candidato idóneo para examinar la presencia de sustancias que interfieren con el mecanismo de activación de la protrombina y la acción de la trombina, implicadas en la conversión de fibrinógeno a fibrina en el proceso de coagulación humana.

MATERIAL Y METODO

El material algal fue colectado en la zona intermareal de las localidades que se muestran en las Tablas I, II y III, cuidando de reducir al mínimo la presencia de organismos epífitos, utilizando bolsas de plástico para separar las algas por especie y transportándolas congeladas en hielo seco al laboratorio. El material fue descongelado a temperatura ambiente, limpiado con agua destilada y liberado manualmente de epífitas. Los extractos se preparon con 10 g de material algal que se maceraron en un mortero con 10 ml de solucion salina isotonico (NaCl 0.9 g/H_2O 100 ml) pH 7.2, el homogenado se pasó por tres capas de muselina para retener las partículas grandes y posteriormente

Source : MNHN, Paris

se filtró en un equipo Millipore® utilizando filtros de nitrocelulosa de 22 μm. El extracto así obtenido fue congelado a - 20° C hasta ser usado (Deacon-Smith *et al.*, 1985).

Tabla I - Actividad anticoagulante de extractos de macroalgas marinas mexicanas de la Division Chlorophyta. Los numeros corresponden a los estados de: (1) Oaxaca, (2) Quintana Roo, (3) Guerrero y (4) Tamaulipas.

Especies	**Localidades**	**Tiempo de Trombina** min.	**Tiempo de Prototrombina** min.
Chaetomorpha antennina	Cacalotepec (1)	1.2	1.3
	Zipolite (1)	1.2	1.4
Codium giraffa	Zicatela (1)	> 10	1.0
Codium ithsmocladum	Pto. Morelos (2)	6.0	2.9
Enteromorpha intestinalis	Acapulco (3)	1.1	1.4
	Cacalotepec (1)	1.1	1.3
	Zicatela (1)	1.3	1.3
	Zipolite (1)	1.2	1.4
Halimeda discoidea	Zipolite (1)	> 10	> 10
Halimeda opuntia	Pto. Morelos (2)	1.2	1.6
Halimeda tuna	Pto. Morelos (2)	3.2	2.4
Udotea flabellum	Pto. Morelos (2)	6.7	2.8
Ulva fasciata	Pto Morelos (2)	1.0	1.1
Ulva lactuca	Carrizalillo (1)	2.5	1.2
	Punta Arena (1)	1.3	1.3
Heparina		> 10	> 10

Se recogió sangre humana por punción venosa usando una jeringa de polipropileno y citrato de sodio al 3.2 % como anticoagulante (9 partes de sangre por una parte de anticoagulante). Se centrifugaron las muestras inmediatamente a 1500-2000 rpm durante 15 minutos. El plasma de 10 donadores se combinó y se congeló hasta [illegible] utilización.

Se realizaron pruebas estadarizadas de coagulación de plasma en tubo de ensaye. El tiempo de trombina (Pitney & Dacie, 1953) se midió añadiendo 0.2 ml de cada una de las siguientes soluciones y en el orden que se presenta: plasma, extracto algal, trombina (4 U. I. ml^{-1}) y cloruro de calcio; se agitó suavemente y se incubó durante 60 segundos a 36° C, tomando el tiempo que tardó en formarse en coágulo. Para el tiempo de protrombina (Quick, 1945) se sustituyó la trombina por tromboplastina. Las pruebas se realizaron por duplicado, promediando los resultados de las dos pruebas (cuando la discrepancia entre los resultados fue mayor al 5 %, se repitió la prueba). Como testigo se utilizó solución salina en lugar del extracto algal (Deacon-Smith *et al.*, 1985) y se comparó la actividad anticoagulante contra 0.2 ml de heparina (6.6 $\mu g.ml^{-1}$ = 4 U.I. ml^{-1}).

Source : MNHN, Paris

RESULTADOS

Se realizaron 44 ensayos correspondientes a las siguientes 34 especies de macroalgas marinas: *Chaetomorpha antennina* (Bory) Kützing, *Codium giraffa* Silva, *C. ithsmocladum* Vickers, *Enteromorpha intestinalis* (Linnaeus) Link, *Halimeda discoidea* Decaisne, *H. opuntia* (Linnaeus) Lamouroux, *H. tuna* (Ellis et Solander) Lamouroux, *Udotea flabellum* (Ellis et Solander) Lamouroux, *Ulva fasciata* Delile, *Ulva lactuca* Linnaeus, *Chnoospora minima* (Hering) Papenfuss, *Dictyota bartairesiana* Lamouroux, *D. cervicornis* Kützing, *Padina durvillaei* Bory, *P. gymnospora* (Kützing) Sonder, *Sargassum filipendula* C. Agardh, *S. fluitans* Børgesen, *S. hystrix* J. Agardh, *S. liebmanii* J. Agardh, *S. polyceratium* Montagne, *S. pteropleuron* Grunow, *Stypopodium zonale* (Lamouroux) Papenfuss, *Turbinaria tricostata* Barton, *T. turbinata* (Linnaeus) O. Kuntze, *Amphiroa beauvoisii* Lamouroux, *A. fragilissima* (Linnaeus) Lamouroux, *A. mexicana* W.R. Taylor, *Galaxaura oblongata* (Ellis et Solander) Lamouroux, *Gracilariopsis lemaneiformis* (Bory de St. Vincent) Dawson et Foldvick, *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacquin) Lamouroux, *H. spinella* (C. Agardh) Kützing y *Laurencia poiteaui* (Lamouroux) Howe.

Tabla II - Actividad anticoagulante de extractos de macroalgas marinas mexicanas de la División Phaeophyta. Los números corresponden a los estados de: (1) Oaxaca, (2) Quintana Roo, (3) Guerrero y (4) Tamaulipas.

Especies	**Localidades**	**Tiempo de Trombina** min	**Tiempo de Prototrombina** min.
Chnoospora minima	Cacalotepec (1)	2.5	2.5
	Zicatela (1)	1.2	1.9
Dictyota bartayresiana	Pto. Morelos (2)	2.4	1.0
Dictyota cervicornis	Pto Morelos (2)	1.0	1.1
Padina durvillaei	Acapulco (3)	1.1	1.3
	Zicatela (1)	1.1	1.1
Padina gymnospora	Acapulco (3)	2.3	1.0
	Zicatela (1)	2.1	1.3
Sargassum filipendula	La Pesca (4)	1.3	1.3
Sargassum fluitans	Pto. Morelos (2)	1.1	1.2
Sargasum hystrix	Pto Morelos (2)	> 10	1.4
Sargassum liebmanii	Cacalotepec (1)	2.4	1.0
	Tangolunda (1)	2.3	1.1
Sargassum polyceratium	Pto Morelos (2)	1.0	1.3
Sargassum pteropleuron	Pto. Morelos (2)	1.0	1.4
Styropopodium zonale	Pto Morelos (2)	1.2	1.2
Turbinaria tricostata	Pto. Morelos (2)	1.3	1.0
Turbinaria turbinata	Pto Morelos (2)	1.2	1.1
Heparina		> 10	> 10

Source : MNHN, Paris

Para la prueba de tiempo de trombina, las especies que presentaron un efecto anticoagulante igual al de la heparina fueron *Codium giraffa*, *Halimeda discoidea* (Chlorophyta) y *Sargassum hystrix* (Phaeophyta). El resto de los extractos probados permitieron la coagulación del plasma antes de los diez minutos, destacándose *Udotea flabellum* (Chlorophyta) que impidió la coagulación hasta 6.7 minutos y *Codium ithsmocladum* (Chlorophyta) que retardó la coagulación hasta los 6.0 minutos (Tablas I, II y III).

En el tiempo de protrombina sólo fue afectada la coagulación del plasma por el extracto acuoso de *Halimeda discoidea* en igual proporción que la heparina.

Tabla III - Actividad anticoagulante de extractos de macroalgas marinas mexicanas de la División Rhodophyta. Los números corresponden a los estados de: (1) Oaxaca, (2) Quintana Roo, (3) Guerrero y (4) Tamaulipas.

Especies	**Localidades**	**Tiempo de Trombina** min	**Tiempo de Prototrombina** min.
Amphiroa beauvoisii	Cacalotepec (1)	1.1	1.3
	Zicatela (1)	2.2	1.2
Amphiroa fragilissima	Pto Morelos (2)	1.3	1.3
Amphiroa mexicana	Tangolunda (1)	1.1	1.4
Galaxaura oblongata	Pto. Morelos (2)	1.0	1.0
Gracilariopsis lemaneiformis	Pto. Morelos (2)	3.3	1.3
Hypnea musciformis	La Pesca (4)	1.6	1.0
Hypnea spinella	La Pesca (4)	1.6	1.6
Laurencia poiteaui	Pto. Morelos (2)	1.0	1.7
Heparina		> 10	> 10

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Debido a la acción de la trombina activada (enzima proteolítica) sobre la molécula de fibrinógeno, se escinden péptidos (fibrinopéptidos), separándose de la molécula. Estos monómeros [redacted] polimerizan después para formar la fibrina (Davie & Ratnoff, 1964). Al parecer, en los extractos que tuvieron actividad anticoagulante, alguna sustancia, probablemente un polisacárido sulfatado, interfiere con el proceso de coagulación en alguna de las siguientes formas:

1. Impide la conversión de protrombina [redacted] trombina, ya sea por no permitir el desdoblamiento de la protrombina para que sea activada (Seegers, 1962), o bien, por interactuar con alguno de los factores indispensables para este proceso.

2. Impide la acción de la trombina sobre el fibrinógeno, posiblemente inhibiendo su acción proteolítica (Laki, 1965).

3. El extracto de *Halimeda discoidea* afectó el tiempo de trombina y protrombina, lo cual sugiere la presencia de una molécula con capacidad de intervenir [redacted] la

Source : MNHN, Paris

inhibición de la coagulación a nivel del proceso de reacciones en cascada (Davie & Ratnoff, 1964).

Si bien, el método de extracción no fue el idóneo para obtener un concentrado en polisacáridos sulfatados como el utilizado en la extracción de fucanos de algas cafés por Nishino *et al.* (1989) y carragenanos de algas rojas usado por Hawkins *et al.* (1962) (extracción [redacted] caliente y precipitación con etanol), el método empleado, modificado de Deacon-Smith *et al.* (1985), nos permitió obtener un extracto con una gama de polisacáridos que intervinieron en la inhibición del proceso de coagulación del plasma y además permitió obtener alguna sustancia presente en los extractos de algas de la División Chlorophyta, caso particular de *Halimeda discoidea*, capaces de ejercer un doble efecto a nivel de los tiempos de trombina y protrombina.

Los extractos probados interfirieron con la coagulación del plasma humano básicamente en la conversión de fibrinógeno a fibrina por acción de la trombina. Destaca la acción anticoagulante de los extractos de las especies de Chlorophyta, antes no reportados con esta propiedad, así como, la doble acción del extracto de *Halimeda discoidea*.

Se requiere una investigación más profunda sobre los efectos anticoagulantes de estas algas, sobre todo en el caso de *Halimeda discoidea*, ademas de la identificación de los compuestos, debido a que no pueden ser excluidas otras sustancias como las responsables del efecto anticoagulante.

LITERATURA CITADA

ANDERSON W. & DUNCAN J.G.C., 1965 - The anticoagulant activity of carrageenan. *J. Pharm. Pharmacol.* 17: 647-654.

DAVIE E.W. & RATNOFF O.D., 1964 - Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 145: 1310.

DEACON-SMITH R.A., LEE-POTTER J.P. & ROGERS D.J., 1985 - Anticoagulant activity in extracts of British marine algae. *Bot. Mar.* 28: 33-338.

ELSNER H., BROSNER W. & BURGEL E., 1937 - Über das Vorkommen von Hocwirksamen die Blutgerinnung Hemmenden Stoffen in Rotalgen. *Ztschr. Physiol. Chem.* 246: 244-247.

GÜVEN K.C., UTUTIN S.B., MUTTAY E. & ULUTIN O.N., 1973/74 - Anticoagulant-antithrombin and fibrinolytic actions of extracts of marine alga *Corallina rubens* L. *Haemostasis* 2: 260-268.

GÜVEN K.C., ÖZSOY Y. & ULUTIN O.N., 1991 - Anticoagulant, fibrinolytic and antiaggregant activity of carragenans and alginic acid. *Bot. Mar.* 34: 429-432.

HAWKINS W.W. & O'NEILL A.N., 1955 - The anticoagulant action in blood of sulphated derivatives of Laminarin. *Can. J. Biochem. Physiol.* 246: 244-247.

HAWKINS W.W. & LEONARD V.G., 1962 - Antipeptic and antithrombic properties of carrageenin. *J. Lab. & Clin. Med.* 60: 641-648.

KIDNESS G., LONG W.F., WILLIAMSON F.B. & BOYD J., 1979 - Effects of carragenans on the aggregation of human blood platelets. *Thromb. Res.* 15: 3-15.

LAKI K., 1965 - Enzymatic effects of thrombin. *Fed. Proc.* 24: 794-799.

NISHINO T., YOKOYAMA G., DOBASHI K., FUJIHARA M. & NAGUMO T., 1989 - Isolation, purification, and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the

Source : MNHN, Paris

brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities. *Carbohydr. Res.* 189: 119-129.

NISHINO T., KIYOHARA H., YAMADA H. & NAGUMO T., 1991 - An anticoagulant fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Phytochem*. 30: 535-539.

PERCIVAL E., 1979 - The polysaccharides of green, red and brown seaweeds. Their basic structure, biosynthesis and function. *Br. Phycol. J.* 14: 103-117.

PITNEY W.R. & DACIE J.V., 1953 - A simple method of studying the generation of thrombin in recalcificated plasma. *J. Clin. Path.* 6: 9-13.

QUICK W.R., 1945 - On the quantitative estimation of prothrombin. *Amer. J. Clin. Path.* 15: 560-566.

SEEGERS W.F., 1962 - *Prothrombin*. Cambridge. Mass., Harvard University Press.

SPRINGER G.F., WURZEL H.A., McNEIL G.M., NASELL N.J. & DOUGHTY M.F., 1957 - Isolation of anticoagulant fraction from crude fucoidin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94: 404-409.

VARGAFTIG B.B., 1977 - Carrageenan and thrombin trigger prostaglandin synthetase-independent aggregation of rabbit platelets: inhibition by phospholipase A2 inhibitors. *J. Pharm. Pharmacol.* 29: 222-228.

Source : MNHN, Paris